Л.Ф. Курило, В.В. Джамбор
(ГУМедико-генетический научный центр РАМН, Москва)

ПРОБЛЕМЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

В настоящее время в медицинской практике в основном проводят криоконсервацию зрелых мужских гамет с целью их дальнейшего использования для искусственной инсеминации (ИЙ) или для репродуктивных технологий (Glander, Schaller, 2000; Isachenko et al.,2004). Значительно реже и менее успешно проведение криоконсервации ооцитов из крупных полостных и предовуляторных фолликулов. На стадии разработки находятся исследования по культивированию ооцитов in vitro с целью их дальнейшего развития и созревания (Edwards, Brody, 1995; Eppig,1997; Jaroudi et al., 1997; Kwang et al., 2000). Относительно результатов этих попыток информация не всегда корректна, технологии и критерии оценки такого культивирования незрелых женских гамет (и гонад) человека требуют дальнейшей отработки. Само по себе криоконсервирование ооцитов из предовуляторных фолликулов не рассматривают как наиболее удачный способ сохранения зрелых женских гамет, поскольку отмечена низкая частота жизнеспособных ооцитов после их оттаивания.

Криоконсервацию эмбрионов человека (ЭЧ) при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с целью лечения бесплодия выполняют в случаях получения более 2-3-х эмбрионов в одном цикле и для сохранения неиспользованных в данном цикле эмбрионов для их переноса женщине, при необходимости, в следующих циклах.

В настоящее время показания для криоконсервации ЭЧ разрабатываются и расширяются. Например, в случае развития синдрома гиперстимуляции яичников, при котором высока вероятность неудачной имплантации и/или нарушения развития эмбриона оптимальным вариантом считают является криоконсервация полученных ЭЧ для использования их в следующих циклах. Подобный же подход рекомендуют для пациенток с синдромом поликистозных яичников. Согласно современной литературе, криоконсервация (в жидком азоте при медленном замораживании) не вызывает морфо-функциональные нарушения эмбриогенеза и не повышает уровня (частоты) развития многоплодной беременности. Имеются противоположные мненчя относительно безопасности или риска повреждения при криоконсервации ЭЧ на стадии бластоцисты. Накаяма с коллегами сообщают о снижении частоты наступления имплантации и беременности в случаях переноса ЭЧ женщине после их оттаивания вследствие криоконсервации (Nakayama et al.,1995). Согласно другим публикациям, использование при переносе женщине ЭЧ после их криоконсервации и оттаивании повышало частоту наступления имплантации и беременности (Fehilly et al.,1985). Т.е. очевидна необходимость дальнейшего совершенствования (оптимизации) технологии медленного криоконсервирования ооцитов и ЭЧ, отработки оптимальной схемы подготовки пациенток к переносу ЭЧ после их криоконсервации.

Метод витрификации половых клеток и эмбрионов основан на быстром воздейстивии криопротекторов определенных концентраций при режиме быстрого снижения температуры. Фактически витрификация отражает естественное замораживание клеток, тканей, организма, происходящее в природе при смене сезонов и наступлении холодов (минусовой температуры).

При витрификации происходит быстрое вытеснение воды из клеток, что предотвращает ее превращение в лед, кристаллизацию молекул воды в клетке с повреждением последней. Следующим этапом витрификации является помещение нитрифицированных клеток в жидкий азот. Получены доказательства тому, что при использовании техники витрификации частота выживаемости эмбрионов человека значительно возрастает, по сравнению с этим показателем при традиционной (рутинной, медленной) криоконсервации, используемой в репродуктивных технологиях; Например, при модифицированном способе витрификации эмбрионов человека, направленном на устранение токсичности криопротекторов (путем снижения их концентрации и длительности их влияния) повышается в 1,2 раза частота выживаемости ЭЧ (по сравнению с техникой их медленной криоконсервации), в 4,3 раза - частота их имплантации и в 2,4 раза - частота наступления клинической беременности (Джамбор, 2005). При применении метода

витрификации ооцитов человека, разработанного Куваямой (Kuwayama, 2001) в модификации, установлена высокая частота выживаемости клеток и высокая частота их нормального оплодотворения (92,4% и 83,6%, соответственно) (Джамбор, 2005).

Доля оплодотворения зрелых ооцитов в программе ЭКО составляет 80-90% (Liu et al., 1995).

Необходимо расширение современных представлений о биобезопасности или риске для половых клеток и эмбрионов при проведении любых методов биотехнологии, в том числе - и методов криоконсервирования, с целью профилактики гамето- и эмбриопатий, для разработки профилактических мероприятий, направленных на сохранение репродуктивного здоровья поколений.

В настоящее время не определен статус эмбриона человека, т.е. с какого периода развития ЭЧ имеет право на защиту жизни и человеческого достоинства. В контексте данного сообщения возникает вопрос о мере манипулирования с ЭЧ при ситуациях, не гарантирующих безопасность дня здоровья эмбрионов. Проблема статуса ЭЧ является ключевой в ряде биомедицинских технологий (Курило, 1997; Курило, Шилейко, 2002; Юдин, 1998, Council of Евгоре, CDBI, 1996; 2003). Главная задача человечества - сохранение генетического разнообразия генома человека и сохранение среды обитания человека, сохранение уважения к личности человека с первых этапов его развития. Но с какого периода развития эмбрион человека становится человеческим существом, не определено, несмотря на активное обсуждение на международном уровне этой важной для социо-, законодательства, медицины и био-, в целом для общества проблемы.

Подовые клетки уникальны по своему ввзвачению и закономерностям дифференцировки. В природе миллионы лет оттачавался механизм отбора наиболее жизнеспособных и оплодотворяюще способных гамет. Процесс дифференцировки гамет и его ключевое многостадийное событие - мейоз проходил и проходит жес- [эволюционный отбор. После случайшерекомбинации отцовских и матерингенов в профазе 1 мейоза (на стадии эяготены и пахитены) и в метафазе 1 и 2 мейоза в каждой половой клетке создается уникальный набор генов, унаследованный от обоих родителей, но «модифицированньш» во время мейоза каждой гаметы. Практически на сегодня мы еще не можем говорить о значении геномного импринтинга, также развивающегося в гаметогенезе и обеспечивающего дифференциальную маркировку генов на материнских и отцовских гомологичных хромосомах. Именно эти процессы обеспечивают формирование в каждом поколении разнообразие геномов внутри вида, их жизнеспособность, приспособляемость к среде обитания и стабильность вида. Т.е. сказанное свидетельствует о необходимости соблюдения крайней осторожности в проведении каких бы то ни было манипуляций с половыми клетками любых видов, и человека - также, и в 1-ую очередь, организации системы регуляции работы с гаметами и эмбрионами любых видов, обеспечение их биобезопасности.

Рабочей группой по защите эмбриона и плода человека (CDBI-CO-GT3) Руководящего Комитета по Биоэтике (CDBI) Совета Европы был создан Доклад «Защита эмбриона человека in vitro» (июнь, 2003 г.). Его целью являлось проанализировать и обсудить имеющиеся в странах Европы позиции, положения и документы, касающиеся защиты ЭЧ in vitro и аргументы, поддерживающие необходимую обозначенную защиту. В докладе приведены: краткие сведения о биологии развития ЭЧ, медико-биологические сведения об ЭСК человека; обсуждения философов на тему его природы и статуса; обсуждения этических проблем, возникающих при ЭКО и ПЭ, ПИД. Подчеркивается, что определение статуса ЭЧ, основанное на строгих аргументах, остается в поле фундаментальных противоречий. Наличие различных, прямо противоположных точек зрения на эту проблему препятствуют в настоящее время определить единую позицию относительно мер защиты ЭЧ in vitro. Несмотря на вышеуказанные сложности и противоречия при решении проблемы статуса ЭЧ, остаются возможности и острая необходимость дальнейшего обсуждения ряда вопросов по данной ключевой теме в свете последних достижений медицины, биологии, биомедицинских технологий (Report by the Working Party on the Protection of the Human Embryo and Fetus. The protection of the human embryo in vitro. Strasbourg, June 2003; 44P).

Только когда есть прецедент решения подобных вопросов, после воедино собранных аргументов, доводов и предположений, изученных и учтенных последствий используемых технологий - принятое решение может оказаться оптимальным и корректным.

Некоторые пути решения этико-правовых проблем биомедицинских технологий: информирование населения и специалистов; широкое обсуждение этих проблем в обществе; создание соответствующих подзаконных актов и законодательства; регулирование работы соответствующих учреждений, использующих биомедицинские технологии, через систему этических комитетов обязательно с независимыми экспертами ряда специальностей: медиками, биологами, юристами, социологами, богословами, этиками, философами, организаторами здравоохранения; ежегодные отчеты таких учреждений перед этическими комитетами с конкретными протоколами применения методов биотехнологии по каждому пациенту.

Литература:

Джамбор В.В. Усовершенствование программы экстракорпорального оплодотворения человека с помощью применения метода витрификации. Автореф-т дисс. канд. биол. наук, МГУ им. М.В. Ломоносова, М., 2005,25.

Курило Л.Ф. Некоторые морально-этические проблемы репродукции человека. В кн. Биомедицинская этика. Ред. В.И.Покровский, М.: Медицина, 1997,151-171.

Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. Этико-правовые аспекты репродуктивных технологий и технологии эмбриональных стволовых клеток человека. В кн. Биомедицинская этика. Ред. В.И.Покровский, Ю.М.Лопухин. М.: Медицина, 2002,98-114.

Юдин Б.Г Принципы биоэтики./ Биоэтика: принципы, правила, проблемы. М.: Эдиториалб 1998,. 215.

Edwards R., Brody S. Principles and Practice of Assisted Human Reproduction / Philadelphia, Saunders, 1995,112.

Eppig J. Oocyte maturation / In vitro Fert. and Assist. Reprod., Bologna, Monduzzi Editore, 1997,133-138.

Glander H.-X, Schaller X Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa./ Cell a.Tissue Banking, 2000,1,133-142.

Isachenko V, Isachenko E., Kathkov I. Et al. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. VBiol.Reprod.,2004,71,1167-1173.

Jaroudi K., HoUanders J., Sieck U. et al. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in vitro - matured oocytes / Hum. Reprod. 1997. Vol. 12. P. 857-859.

Fehilly C. et al. Creyopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study./ Fertil. Steril. ,1985,44,638-644.

Kuwayama M., Kato O. Successful vitrification of human oocytes. /Fertil. Steril., 2000,74,349.

Kuwayama M. Vitrification of human oocytes and embryos. /In: IVF Update (in Japanese), ed. Suzuki S. / Medical View Co.,Tbkyo, Japan, 2001,230-234.

Kwang Y.,Cha M., Se Y. et al.. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfwer without stimulation in women with polycystic obarian syndrome./ Fertil. Steril., 2000,73,978-983.

Liu L., Nagy Z., Joris H. et al.. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles./ Hum. Reprod.,1995,10, 2630-2634.

NakayamaT., Goto Y, Kanzaki H. et al.. Developmental potential of frozen-thawed human blastocysts./ X Assist. Reprod. Genet., 1995,12,239-243.

Report by the Working Party on the Protection of the Human Embryo and Fetus (CDBI-CO-GT3). The protection of the human embryo in vitro. Council of Europe^ Steering Committee on Bioethics (CDBI), Strasbourg, June 2003; 44P.

Report 3-rd Sympos. on Bioethics: Medically -assisted procreation and the protection of the Human Embryo, Council of Europe, CDBI, Strasbourg,1996.

В.Т. Какпаков

(Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва)

ЦЕНТР ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО (ИСКУССТВЕННОГО) ОСЕМЕНЕНИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ (ЦИОМП)

Институт общей генетики им. Н.И, Вавилова РАН, Москва Криоконсервация семени производителей сельскохозяйственных и диких животных и искусственное осеменение самок давно нашли широкое применение. Медоносная пчела единственный объект, для которого эти методы находятся на стадии экспериментальной разработки.

Первые успешные опыты по сохранению спермы трутней медоносной пчелы в жидком азоте были проведены в нашей стране А.Н. Мельниченко и Ю.Л. Вавиловым в 1975 г. [1976]. В качестве разбавителя спермы они использовали разведенную в 10 раз гемолимфу тех же трутней. При этом криопротектор не добавляли. Д. Хербо [1977,1979], применив в качестве криопротектора 25% диметилсульфоксид (ДМСО), получил 8% расплода рабочих особей от маток, искусственно осеменных дефростированной (оттаянной) спермой. О. Кафтаноглу и Я. Пенг [1984] испытали 11 различных солевых растворов, содержащих криопротектор ДМСО. При соотно-